

酵母細胞壁溶解酵素の研究

—第3報 溶解酵素生産菌 *Bacillus cereus* 113株の同定
ならびに溶解酵素産生のための培養条件について—
江幡淳子・浅井理恵子

Studies on the Enzymatic Hydrolysis of Yeast Cell Walls

Part 3. Identification and Culture Conditions
of a Lytic Enzyme Producing Bacterium, strain 113

JUNKO EBATA AND RIEKO ASAI

はじめに

著者らの研究室で分離した酵母細胞壁溶解酵素生産菌の3菌株のうち、202株についてはすでに *Streptomyces hygroscopicus* に属する一菌株であることを同定し、この菌の溶解活性生産のための培養条件や粗酵素の性質を調べた結果について、前二報¹⁾に報告した。さらにその後溶解酵素の画分を試みた結果、プロテアーゼ作用の高い画分、酵母グルカンの分解作用とプロテアーゼ作用の両作用を含む画分、酵母グルカンおよびラミナリンの両者に作用するグルカナーゼ画分、特異性未知の溶解活性を含む画分の4つの画分に分離された²⁾ので目下各画分について精製を行い、酵母細胞壁に対する溶解酵素の解析を進めている。

一方113菌株については生育の肉眼的観察から好気性細菌に属する一菌株と思われたので、菌学的分類を行ない、*Bacillus cereus* に属する一菌株であることを明らかにした。さらに本菌の酵母細胞壁溶解酵素産生のための培地組成についても検討を加えたので今回は113 菌についての知見を報告する。

実験方法

1. 113菌株の形態観察

菌の保存、生育の肉眼的観察ならびに顕微鏡による観察のために表-1に示す組成の二種の培地を用いた。細胞のグラム染色はHuckerの変法³⁾に基づいて行ない観察のための既知のグラム陽性菌として *E. coli* を、グラム陰性菌として *L. casei* を用いた。

表-1 形態観察ならびに保存用培地組成

肉汁寒天培地		酵母寒天培地	
肉エキス	1.0%	乾燥酵母(製パン用)	1.0%
ポリペプトン	1.0%	K ₂ HPO ₄	0.2%
NaCl	0.3%	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.01%
寒天	1.5%	寒天	1.5%
pH	7.0	pH	7.0

2. グラム陽性菌の第一次鑑別法

主としてCowanらによる手引書⁴⁾に従い、以下に示す第一次鑑別法によって、グラム陽性菌である本菌の該当する群を明らかにした。

- 形：表1に示す固体培地上で37℃、48時間培養後1500倍で検鏡した。一部はメチレンブルーによる染色標本を用いて観察した。
- 芽胞：Moellerの変法⁵⁾に基づき染色後検鏡を行なった。
- 運動性：肉汁培地および運動性検査用培地を用い、生育の適温より低い27℃で培養し懸滴法で観察した⁶⁾。
- 空気中での発育：肉汁寒天培地上での生育を観察した。
- カタラーゼ：3%過酸化水素の一滴に肉汁培地で生育した菌体を白金耳でつけ、気泡の有無を調べた。
- オキシダーゼ：肉汁寒天培地で培養した菌体を tetramethyl-*p*-phenylenediamine を浸み込ませた濾紙に塗りつけて、青色の発色を観察した⁷⁾⁸⁾。
- OFテスト：Hugh-Leifson⁹⁾の培地を入れた2本の試験管に菌を培養し、その中の1本には流動パラフィンを重ねて糖の分解ならびに酸の生成が酸化か発酵かのテストをおこなった。

3. 第二次鑑別表による菌種の同定

第一次鑑別法による性状から 113 菌は、好気性芽胞菌群 (*Bacillus*) に属することが明らかであったので、ついで *Bacillus* の第二次鑑別表¹⁰⁾を用いて菌種の同定をおこなった。菌種の特徴づけに選ばれた性状はつぎの通りである。

- a) グラム反応,
- b) 運動性,
- c) 形態群: 胞子の形, 大きさ, 胞子のうの形, 胞子のうのふくらみの具合により分類した。
- d) 芽胞の形
- e) 芽胞の位置
- f) 菌体の膨張
- g) 45℃, 65℃における発育
- h) pH 5.7 における発育
- i) 7% NaCl における発育
- j) クエン酸塩の利用: Christenser agar¹¹⁾での生育に伴ない試薬として加えられたフェノールレッドが赤変するかどうかをしらべた。

h) 炭水化物 (グルコース, アラビノース, マンニト, キシロース) の資化性⁹⁾: OF 培地に炭水化物を添加し生育に伴う pH の変化をしらべる。

i) VP 反応 (Voges-Proskauer 反応)^{12) 13)}: ブドウ糖—リン酸塩 (または塩化ナトリウム) —ペプトン水に培養した菌液についてアセトイン生成の有無をしらべた。

m) デンブ加水分解: 0.2% の可溶性デンブを含む肉汁寒天平板培地に菌を画線培養し, 画線部分の周囲に透明な部分が認められたならば分解陽性とした。

n) 硝酸塩還元^{14) 15)}: 硝酸塩肉汁を用いた 1~数日後の培養液について亜硝酸塩検出試薬¹⁶⁾による還元生成物を調べた。

o) インドールの生成: 1% ペプトン水に培養した菌液に Kovacs 試薬を加えて振盪し, 溶媒層が赤色になれば陽性と判定した。

p) ゼラチンの加水分解^{17) 18)}: 0.4% のゼラチンを含む肉汁寒天平板に菌を画線培養し, 菌の生育した 3~5 日後に塩酸—塩化第二水銀溶液を注いで画線の周囲が透明でたんばくの変性による白濁がなければ液化能陽性と判断した。

g) カゼインの加水分解: Hastings の変法^{19) 20)}を用い牛乳培地上に生育した菌の周囲に溶解帯が見られれば陽性とした。

4. 菌の液体培養

a) 前培養: 500ml 容振盪フラスコに製パン用乾燥酵母 (オリエンタル酵母製) 1.0%, K_2HPO_4 1.0%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01%, NaCl 0.1% (pH 7.0) を含む基礎液体培地 100ml を入れ, 本菌 1 白金耳を接種し, 37℃ 48 時間振

盪培養した。

b) 本培養: 乾燥酵母 1.0%, $(NH_4)_2HPO_4$ 1.2%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02%, NaCl 0.02% を含む培地に各種窒素源, 炭素源の一定量を加えた組成の培養基 100ml を pH 7.0 に調整し, これを本培養基として振盪フラスコに入れて滅菌し, 無菌的に前培養液を 2ml ずつ加えて 38℃ で振盪培養した。

5. 使用した培地成分の炭素および窒素含量の測定

培地に用いた各物質の全糖量の測定はグルコースを標準に用いて, フェノール硫酸法²¹⁾の発色条件を改変して行った。これより炭素含量を求める際にはグルコース中の炭素の比率を 40% として算出した。窒素含量はケルダール法²²⁾により測定した。この分析法によって求められた培地成分の炭素及び窒素含量はつぎの通りであった。

培地用試料	C%	N%	培地用試料	C%	N%
乾燥酵母	15.2	5.72	大豆粕	20.7	15.7
自己消化処理酵母	22.3	5.30	5% 大豆粕抽出液	0.8	13.1
Corn steep liquor	1.1	4.45	大豆粉	11.8	8.1
ポリペプトン	—	13.01			

※0.2% 水酸化ナトリウム溶液中で 1 時間加熱抽出した濾液

6. 酵母細胞溶解活性 (Lytic-Activity, L. A. と略) の測定法

a) 基質酵母の乾量減少による測定法: 前報⁹⁾に従い, 基質として乾燥酵母 (オリエンタル酵母社製) 100mg を 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 1ml に懸濁させ, これに粗酵素液 8ml を加えて 40℃, 20 時間反応をおこなった。L. A. は基質酵母の残乾量と酵素反応による酵母の残乾量の差を基質酵母の残乾量で除し, その百分率で表示した。培地条件の検討はこの方法でおこなった。

b) 基質酵母の濁度減少率による測定法: Yamamoto²³⁾らの方法に準じ, PR—緩衝液 (0.6M 塩化カリウムを含む 0.02M リン酸緩衝液 pH 7.0) に懸濁した酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 0.5ml に酵素液 1.0ml を加え, PR—緩衝液 0.5ml を加えて全量 2.0ml にし 40℃ で 1 時間振盪させながら反応させる。反応終了後 5.0ml の水を加えて浸透圧を下げさらに 10 分間振盪したのち比色計 (Spectronic 20) を用いて 610nm における濁度を測定した。対照として酵素液の代りに 0.02M リン酸緩衝液を加えて同様に反応させ濁度を測定した。L. A. は両者の濁度の差を対照の濁度で除した値の百分率で示した。こゝで基質に使用した酵母は Wickerham 培地 (酵母エキス 0.3%, 麦芽エキス 0.3%, ペプトン 0.5%, グルコース 1.0%, 寒天 2%, pH 6.8) 100ml に *S. cerevisiae* を接種し 30℃, 20 時間振盪培養したのち, この前培養液 15ml を同一培地

組成の本培地に接種し30℃、4時間振盪培養して得た対数期の細胞を用いた。遠心分離(5000r.p.m. 10分間)して集めた酵母細胞を、水で1回、PR-緩衝液で2回洗浄したのち、水で14倍に希釈した時の610nmにおけるO.D.値が0.7を示す濁度になるようにPR-緩衝液に懸濁し基質液として使用した。この条件をほぼ充すためには、培地100mlに生育した酵母の全量を12.5mlのPR-緩衝液に懸濁すればよい。

7. グルカナーゼ活性の測定法

a) ラミナリンを基質とする測定法：ラミナリン(Nutritional Biochemical Corporation)2.0mgを含む0.1M酢酸緩衝液(pH5.0)1.0mlに酵素液1.0mlを加えて40℃、60分反応させた後、銅液2.0mlを加えて反応を停止させ、生成した還元力を、Somogyi-Nelson法²⁴⁾により、グルコースを標準として測定した。この反応条件下でグルコースとして10μgを生ずる酵素量を1単位(U)とした。

b) 酵母グルカン(酵母細胞壁)を基質とする測定法：酵母グルカンは三崎の方法²⁵⁾に従って当研究室で調製した。この基質1mgを含む0.1M酢酸緩衝液(pH5.0)1.0mlに酵素液1.0mlを加えて40℃、60分反応させたのちTCA混液²⁶⁾0.5mlを加えて反応を停止した。反応液を3000r.p.m. 10分間遠心し、上清液中の可溶性糖をフェノール硫酸法²⁷⁾により測定した。すなわち試料液0.1mlと2.5%(w/w)フェノール2.0mlを混ぜ、ついで濃硫酸5.0mlをすみやかに加えて振り混ぜ反応液が室温まで低下したのち比色計(Spectronic 20)を用いて490nmにおける吸光値を測定した。対照はTCA混液を含む基質液に酵素液を加えて上と同様に発色させ、両者の吸光値の差から、グルコースによる標準曲線を用いて、酵素反応による生成糖量を算出した。

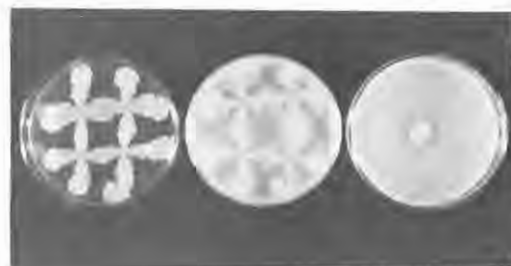
8. プロテアーゼ活性の測定法

カゼイン-275nm吸収B法²⁸⁾に準拠し、0.6%カゼイン溶液(pH7.0)5.0mlに酵素液1.0mlを加え、30℃、30分間反応させたのち、TCA混液5.0mlを加えて反応を停止し、生じた沈殿を濾過して濾液の275nmにおける吸光値を10mmセルを用いて測定した。この条件で275nmにおける吸光値0.01を生ずる酵素量を1単位(U)とした。

実験結果および考察

1. 113菌の同定

a) 寒天平板培地における菌の生育と細胞形態の観察：本菌は表-1の培地によく生育し、酵母培地上では写真-1に示されるように接種2日後コロニーの周辺に輪郭のぼやけた溶解帯(C)が観察され培養時間の経過とともに培地の酵母は利用され透明になった。顕微鏡観察では、グラム陽性の桿菌で孢子形成能を有することが明らかで、



(a) (b) (c)

写真-1 *Bacillus cereus* strain No. 113の肉汁及び酵母寒天培地上における生育(培養2日後)

27℃で生育した菌に運動性は認められなかった。以上より本菌は好気性グラム陽性菌に該当するものと判断した。

b) 属の鑑別：グラム陽性菌の第一次鑑別表に基づいて得られた113菌株の性状を表-2に示した。この結果よりグラム陽性桿菌で芽胞を産生できるのは*Clostridium*属と*Bacillus*属であるが、好気条件下で発育でき、カタラーゼ陽性であることから本菌は*Bacillus*属の性状に一致することが明らかとなった。

表-2 第一次鑑別法による113菌の性状

観 察 項 目	性 状	観 察 項 目	性 状
形	桿 状	カタラーゼ	+
芽胞	+	オキシダーゼ	-
運動性	-	ブドウ糖(酸)	+
空気中での発育	+	O/Fテスト	発 酵

表-3 *Bacillus*属の第二次鑑別法による113菌の性状

グラム反応	+	炭水化物の利用性	
運動性	-	グルコース	+
形態群*	1群	アラビノース	-
芽胞の形	卵円形	マンニット	-
芽胞の位置	中 立	キシロース	-
菌体の膨張	-	V P 反応	+
45℃における発育	+	硝酸塩還元	+
65℃における発育	-	インドール産生	-
pH5.7における発育	+	デンプン加水分解	+
7% NaClにおける発育	+	ゼラチンの液化	+
タエン酸塩利用	+	カゼインの消化	+

*形態群

- 1群 芽胞は卵円形または円柱状、中立、準端立または端立。菌体はわずかに膨隆、または全く膨隆しない。
- 2群 芽胞は卵円形、まれに円柱状、中立、準端立または端立。菌体は明瞭に膨隆。
- 3群 芽胞は球状、端立または準端立。菌体は膨隆。

c) 種の鑑別: *Bacillus* 属の第二次鑑別表に従って種を分類する指標となっている生理的性質を調べた結果を表 3 に示した。これらの性状が最も類似している菌種は *B. anthracis* と *B. cereus* であるが、Bergy's manual²⁷⁾ に記載されたこれら二菌種の特徴を本菌の性状と比較すると、本菌は仮根状の colony を形成し、非運動性を示し 45℃ において僅かながら生育が観察され、クエン酸塩を利用し、病原性を有しないところから *Bacillus cereus* に属すると結論され且つ *Bacillus cereus* var. *mycoides* に最も類似することが明らかであった。以上の結果に基づいてわれわれは本菌を *Bacillus cereus* strain No. 113 と呼称することとした。

2. 溶解酵素産生のための培地組成の検討

a) 無機塩: 菌の生育に伴って菌体外に分泌される溶解酵素を安定させるために本培養基中の無機塩組成を、 K_2HPO_4 1.0%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01%, $NaCl$ 0.1% とした場合と、 $(NH_4)_2HPO_4$ 1.2%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02%, $NaCl$ 0.02% とした場合について、それぞれに有機栄養源として乾燥酵母 1.0% を加えて pH 7.0 に調整し、本菌を接種し経時的に追跡した結果、後者の培地の方が pH の上昇が抑制され、培養 3 日～4 日後のグルカナーゼ活性も高いことがわかった (図-1) ので、以下の本培養には $(NH_4)_2HPO_4$ を含む培地を基礎液体培地として使用した。

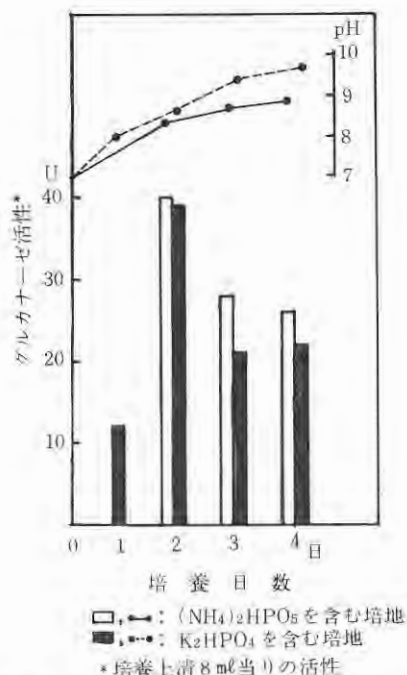


図-1 培地の pH 変化およびグルカナーゼ産生に及ぼす無機塩の影響

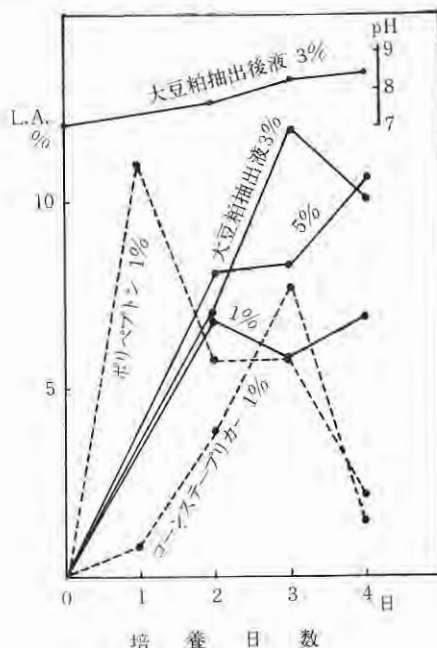


図-2 溶解活性の産生に及ぼす培地窒素源の影響 (グルコース無添加の場合)

b) 有機栄養源: 上記の基礎液体培地に窒素源としてコーンステープリカー 1.0%, ポリペプトン 1.0%, 大豆粕抽出液 1～3% をそれぞれ添加した培地とこ

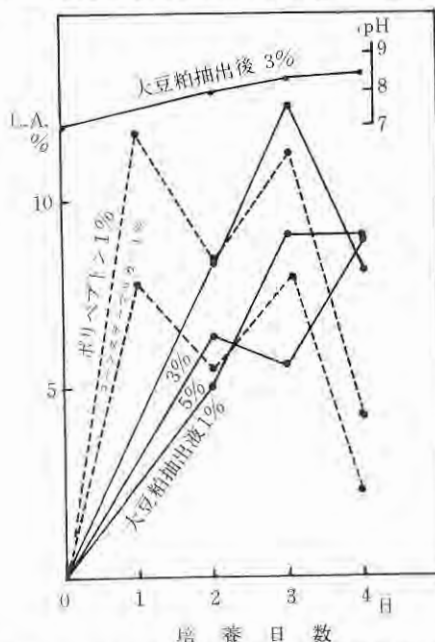


図-3 溶解活性の産生に及ぼす培地窒素源の影響 (グルコース添加の場合)

表-4 培地の栄養源の種類と溶解活性

基礎液体 培地組成 %	培地に添加した成分		培地 C/N比	最高活性について				
	窒素源 %	炭素源 %		培地 日数	pH	L.A.* %	グルカナゼ* U	プロテアーゼ* U
(NH ₄) ₂ HPO ₄ 1.2 MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.02 NaCl 0.02 乾燥酵母 1.0 pH7.0	コーンステープ リカー	無添加	1.6	3	8.4	8.1	14.4	4.8
	グルコース	1.0	5.5	3	8.5	7.8	18.8	4.0
	ポリペプトン	1.0	1.2	1	8.6	11.8	25.6	16.8
	グルコース	1.0	4.2	1	8.2	11.1	20.8	4.8
	大豆粕抽出液	1.0	1.8	4	7.6	7.1	9.6	10.4
	グルコース	1.0	6.6	3	7.5	9.1	12.8	8.8
	グルコース	3.0	1.2	3	8.2	12.0	28.0	13.6
	グルコース	1.0	4.1	3	8.3	12.6	15.2	40.0
	グルコース	5.0	0.9	4	8.9	10.7	17.6	41.6
	グルコース	1.0	3.0	4	8.9	9.1	17.6	48.8

*培養上清8.0ml当りの値。

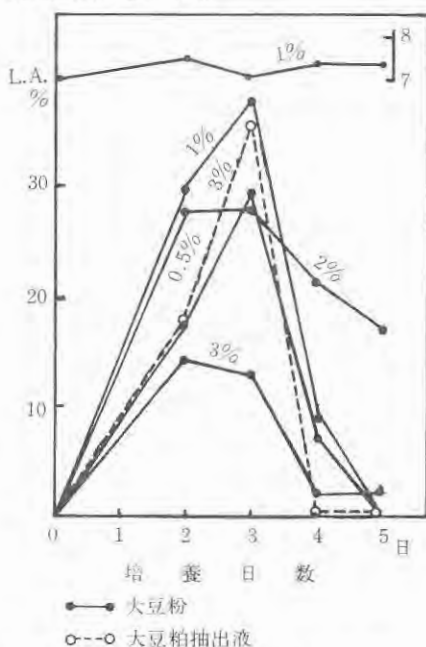


図-4 溶解活性の産生に及ぼす大豆粉濃度の影響

れにグルコース1%を追加した培地に本菌を接種し経時的にL.A.の産生、培地pHの変化、グルカナゼおよびプロテアーゼの活性を調べた。図-2・3及び表-4に示した結果より、窒素源として3%大豆粕抽出液を用いた3日培養後の上清の溶解活性が最もよく、グルカナゼ活性はグルコース無添加の場合、プロテアーゼはグルコース1%添加の場合に最も高いことが明らかである。何れの培地においてもグルカナゼは培養1~2日で最高に達するが、プロテアーゼは3~4日で最高値を示した。ポリペプトンやコーンステープリカーを栄養源に用いた場合L.A.のピークが24時間と72時間培養時に認められるのは、これら二種の酵素活性の増加と関係があるので

表-5 培地の大豆粉濃度と溶解活性

基礎液体 培地組成	培地に添加 した成分	培地 C/N比	最高活性について			
			培養 日数	pH	L.A.* %	グルカ ナーゼ* U
(NH ₄) ₂ HPO ₄ 1.2 MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.02 NaCl 0.02 乾燥酵母 1.0 pH7.0	大豆粉 0.5	2.2	2	7.1	28.0	9.6
	グルコース 1.0	2.0	3	7.1	38.2	12.8
	グルコース 2.0	1.8	3	7.6	30.2	13.6
	グルコース 3.0	1.7	3	7.8	13.8	13.6
	大豆粕抽出液 3.0	1.2	3	7.2	36.1	14.4
	グルコース 1.0	2.6	2	7.4	15.7	5.4

*培養上清8.0ml当りの値

表-6 溶解活性の産生におよぼす自己消化処理酵母 (AWY) 添加の影響

基礎液体 培地組成	培地に添加 した成分 %	培地 C/N比	最高活性について			
			培養 日数	pH	L.A.* %	グルカ ナーゼ* U
表4に 同じ	大豆粉 1.0	2.0	2	7.4	15.7	5.4
	大豆粉 1.0 +AWY1.0	2.6	2	7.3	17.6	7.4

*培養上清8.0ml当りの値

はないかと推察された。上記の各種培地において、グルコースの添加は溶解活性の産生のためにとくに有効ではなかったので以降の培地には加えないこととした。つぎに添加効果のあった大豆粕抽出液の代りに大豆粉を0.5%、1.0%、2.0%及び3.0%の各濃度に加えた培地について上と同様に本菌の培養を行い経時的に溶解活性を追跡した。図-4および表-5に示されるように、大豆粉1%添加時に最も高い溶解活性が得られその値は3%大豆粕抽出液に相当した。大豆粉濃度が2%を超えるときはグルカナゼ、プロテアーゼ両活性の上昇が認められるにもかかわらず溶解活性は低下した。この結果はポリペプトンやコーンステープリカーを栄養源に用いた場合の結果

に対する推察と矛盾するが酵母溶解に関与する酵素はグルカナーゼやプロテアーゼのみならず、これらとは作用を異にする酵素が関与することも充分考えられる。この点を明らかにするためには今後培養上清中の酵素を分離し酵母細胞壁の溶解に関与する酵素作用の解析がなされなければならない。

培地中に添加してその効果が期待される物質として酵母細胞壁成分が考えられるが、今回は圧搾パン酵母を自己消化させ、洗浄乾燥して調製した自己消化処理酵母 (Autolysed washed yeast, AWY)⁽²⁸⁾を用いて添加効果をしらべた。無機塩に1%乾燥酵母と1%大豆粉を加えた培地にさらに1%AWYを添加した場合と無添加の場合とについて、本菌の培養を行なったところいずれの場合も2日目に溶解活性は最高に達し、表-6に示すようにAWYを加えた培地のL.A., グルカナーゼ, プロテアーゼは僅かながら無添加の場合より高かった。さらに前培養時の菌の生育をよくするため培養期間を2日から3日に延ばすことにより本培養時の溶解活性の生産も増強されることが示された (表-7)以上の培養条件の検討結果を総合して、本菌の酵母細胞壁溶解酵素生産のための培養条件を表-8のように設定した。

3. 培養粗酵素の酵母生細胞に対する作用

酵素の分離に先立ち、対数期酵母細胞の懸濁液に表-8による本菌の培養上清液を作用させて溶解反応の1, 2の性質を調べた。活性は濁度減少法によって測定した。

a) 酵素量と溶解速度: 前報⁽¹⁾において、酵母のβ-メルカプトエタノール処理が酵素による溶解作用を促進することが示されたのでこの試薬の 10^{-2} Mを含む緩衝液中で1時間前処理した酵母と未処理酵母を基質とし酵素量を変えて1時間反応させた。図-5はその結果を示しており無処理酵母に対しては酵素量を増加しても溶解率は8%

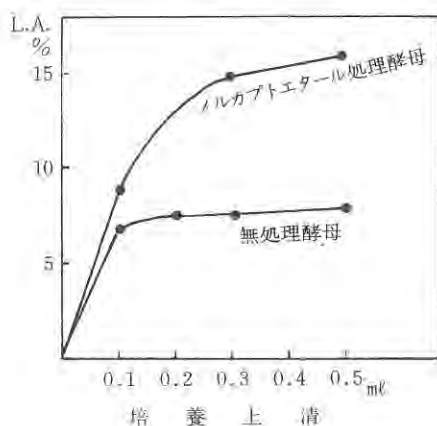


図-5 酵素量と溶解活性

表-7 前培養期間と溶解活性の生産

前 培 養		本培養の最高活性について					
培地組成%	期間 日	培地組成%	培養 期間 日	pH	L.A* %	グルカ ナーゼ* U	プロテ アーゼ* U
乾燥酵母 1.0 K ₂ HPO ₄ 1.0 MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.01 NaCl 0.1	2	基礎液体培地 (表4に同じ) 大豆粉 1.0 AWY 1.0	2	7.3	17.6	7.4	13.6
	3		2	7.7	29.9	7.9	4.0

*培養上清 8 ml 当りの活性

表-8 *Bacillus cereus* 113株の培養条件

前 培 養	本 培 養
乾燥酵母 1.0 %	乾燥酵母 1.0 %
K ₂ HPO ₄ 1.0 %	大豆粉 1.0 %
MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.02 %	AWY 1.0 %
NaCl 0.1 %	(NH ₄) ₂ HPO ₄ 1.2 %
培地 100ml, pH7	MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.02 %
37℃ 72時間振盪培養	NaCl 0.02 %
	培地 100ml, pH7
	37℃ 48時間振盪培養

を限度としてそれ以上に延びないが、メルカプトエタノール処理することにより溶解活性は2倍に促進されることが認められた。このような酵母細胞の酵素的溶解作用に及ぼすSH化合物の促進効果は、起源を異にする他の酵母溶解酵素作用についても観察されており⁽²⁹⁻³³⁾この試薬による処理はpH7~10のアルカリ側で効果が高い⁽³³⁾ことと、メルカプトエタノールのpKが9.3である点を併せ考えると恐らくこの効果は酵母細胞壁のジスルフィド結合の還元由来するものと考えられた。Lampen⁽³⁴⁾が提唱している酵母細胞壁の模式構造によると細胞壁のマナン複合体の内側にはS-S結合で相互に連結したたんぱく質がグルカンと複合体を形成して存在することが示されてお

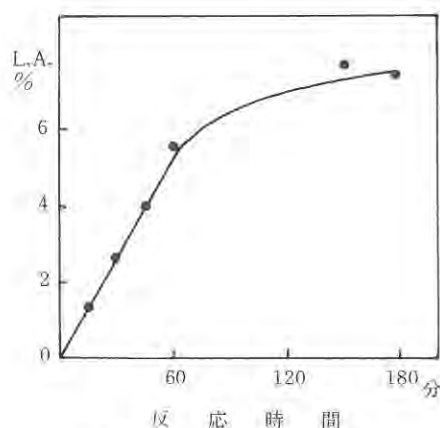


図-6 溶解反応の経時変化

り、この結合の開裂が酵素によるグルカン層の分解を容易にさせることにより結果的には細胞壁溶解の促進効果としてあらわれたのではないかと推定された。

b) 反応の時間的経過：a)と同様の方法でメルカプトエタノール処理した酵母に酵素 1.0ml を作用させ、経時的に濁度の減少を測定した。結果を図-6 に示したがこの測定条件下では反応時間60分までは溶解活性との間に比例関係が成立つことが観察された。

要 約

1. 著者らがさきに分離した酵母細胞壁溶解酵素生産菌3株のうちの113菌株について菌の同定を行なった結果、*Bacillus cereus* に属する一菌株であることを明らかにした。
2. 本菌の培養条件を検討した結果、酵母細胞壁溶解酵素の生産には乾燥酵母1.0%、大豆粉1.0%、AWY1.0%、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1.2%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02%、 NaCl 0.02% (pH7.0) の培地組成が適当であると結論した。

謝 辞

本菌の同定にあたり、御協力をいただいた財団法人発酵研究所、坂野勲博士ならびに今井絃博士に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 江幡淳子、角田万里子、田中えり子、栗田潤子：本紀要, 22, 5 (1974), 23, 17 (1975)
- 2) 江幡淳子：日本農芸化学会昭和51年度大会要旨p.98
- 3) Hucker, G.J. and Conn, H.J. : Tech. Bull. N.Y. St. Agric. Exp. Sta., 93, (1923)
- 4) Cowan, S.T. and Steel, K.J. : Manual for the Identification of Medical Bacteria, 2nd ed., Cambridge University Press, London (1974). 坂崎利一訳：医学細菌同定の手びき, 近代出版, 第2版p.62
- 5) Moeller, H. : Zentble. Bakt. Parasitkde Abt. I. 10 273 (1891)
- 6) Edwards, P.R. and Bruner, D.W. : Circ. Ky Agric. Exp. Sta. 54
- 7) Kovacs, N. : Nature, Lond. 178, 703 (1956)
- 8) Steel, K.J. : J. Appl. Bact. 25, 445 (1962)
- 9) Hugh, R. and Leifson, E. : J. Bact., 66, 24 (1953)
- 10) 坂崎利一訳：医学細菌同定の手びき, 近代出版, 第2版, p.96
- 11) 長谷川武治編著：微生物の分類と同定, 東京大学出版会, p.228 (1975)
- 12) Baritt, M.M. : J. Path. Bact., 42, 441 (1936)
- 13) Fulton, M., Halkias, D. and Yarashus, D. A. : Appl. Microbiol. 8, 361 (1960)
- 14) Daubner, I. : Arch. Hyg. Bakt., 146, 147 (1962)
- 15) Steel, K.J. and Fisher, P. J. : Mon. Bull. Minist. Hlth., 20, 63 (1961)
- 16) 化学の領域増刊47号、生化学領域における光電比色法各論3, 南江堂p.12 (1961)
- 17) Frazier, W. C. : J. Infect. Dis., 39, 302 (1926)
- 18) Pitt, T. L. and Dey, D. : J. Appl. Bact., 33, 687 (1970)
- 19) Hastings, E. G. : Zentble. Bakt. Parasitkde Abt. II, 384 (1903)
- 20) Eddy, B.P. : J. Appl. Bact., 23, 216 (1960)
- 21) Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J.K., Rebers, P. A., Smith, F. : Anal. Chem., 28, 350 (1956), Nature, 168, 167 (1951)
- 22) 赤堀四郎編：酵素研究法第1巻, 朝倉書店p.162 (1955)
- 23) Yamamoto, S. and Nagasaki, S. : J. Eerment. Technol. 50, 117 (1972)
- 24) Somogyi, M. : J. Biol. Chem., 195, 19 (1952), 日本化学会編：実験化学講座第23巻, 丸善, p.417 (1957)
- 25) 三崎旭：蛋白質・核酸・酵素, 15, 1463 (1970)
- 26) 赤堀四郎編：酵素研究法第2巻, 朝倉書店, p.240 (1956)
- 27) Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E. co-editors : Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 8th Ed., Williams & Wilkins Co. (1974)
- 28) Tanaka, H. and Phaff, H.J. : J. Bacteriol., 89, 1570 (1965)
- 29) Bacon, J. S. D., Milne, B. D., Taylor, I.F. and Webley, D.M. : Biochem. J. 89, 28c (1965)
- 30) 黒田彰夫、徳丸陽子、大和田式子：醸工46, 926 (1968)
- 31) Anderson, F. B. and Millbank, J. W. : Biochem. J., 99, 682 (1966)
- 32) Nagasaki, S., Neumann, N. P., Arnow, P., Schnable, L. D. and Lampen, J. O. : Biochem. Biophys. Res. Commun., 25, 158 (1966)
- 33) Obata, T., Fujioka, K., Hara S and Namba, Y. : Agr. Biol. Chem. 41, 671 (1977)
- 34) Lampen, J.O. : Antonie van Leeuwenhoek 34, 1 (1968)

Summary

1. Three strains of microorganisms which able to decompose and grow on yeast cells have been isolated in our laboratory as a result of microbial surveys! One of these isolate, No.113 was formed a colony surrounded by the lysed zone upon the medium containing 1% of baker's yeast. The strain was aerobic, gram-positive, rod-shaped, non-motile, endo-sporeforming, catalase positive and acetoin formation positive, From these distinctive properties, the strain was identified as belonging to *Bacillus cereus*.
2. Conditions for the production of lytic enzyme by the bacterium were investigated. When the medium contained 1.2%(NH₄)₂HPO₄, 0.02% MgSO₄·7H₂O, 0.02% NaCl, 1.0% dried baker's yeast and 3.0% soybean cake extract or 1.0% soybean meal at pH7.0, remarkable production of lytic enzyme in the culture fluid was observed. The addition of 1.0% autolysed and washed baker's yeast was more effective for the production of lytic enzyme.